

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-274924

(43)Date of publication of application : 30.09.2003

(51)Int.Cl. C12M 1/00
C12N 5/06

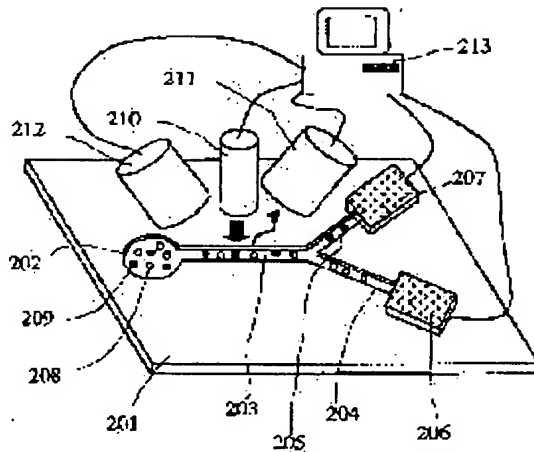
(21)Application number : 2002-130182	(71)Applicant : KIKUCHI JUN TAKAMURA ZEN HORIIKE YASUHIRO
(22)Date of filing : 26.03.2002	(72)Inventor : TAKAMURA ZEN ONODA HIROYUKI HORIIKE YASUHIRO

(54) METHOD AND APPARATUS FOR SEPARATING CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To solve problem that a conventional apparatus for separating cells has disadvantages: having a large size, being expensive and damaging cells a great deal by applying an electric field during separation of the cells.

SOLUTION: In the apparatus for separating the cells a cell inlet, a channel, a branched channel and pumping means are formed on an integrated chip to make the apparatus small and inexpensive. Especially, an electroosmotic flow pump which does not directly apply the electric field to the cells is used as the pumping means.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's

decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-274924

(P2003-274924A)

(43) 公開日 平成15年9月30日(2003.9.30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード*(参考)
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数3 書面 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2002-130182(P2002-130182)

(22) 出願日 平成14年3月26日(2002.3.26)

(71) 出願人 599153220

菊地 純

東京都港区白金台2丁目14番地6号

(71) 出願人 597005598

高村 禪

東京都荒川区南千住4-9-2-401

(71) 出願人 594169385

堀池 靖浩

東京都西東京市東伏見3丁目2番地12号

(72) 発明者 高村 禪

東京都荒川区南千住4-9-2-401

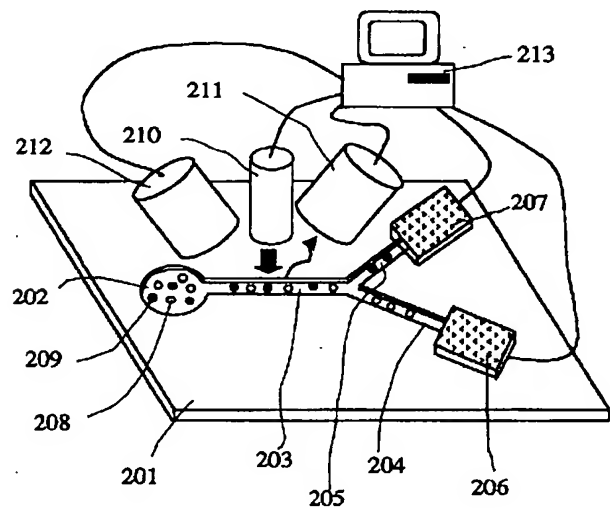
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞分離方法及び装置

(57) 【要約】

【課題】従来の細胞分離装置は大型かつ高価であるという欠点があり、また分離の際に細胞に電界を印加するなどの少なからず細胞に損傷を及ぼすものであった。

【解決手段】装置の小型化、廉価化を図るために細胞導入口、流路、分岐流路およびポンプ手段を一体のチップ上に形成し、かつ特にポンプ手段には細胞に直接電界を印加することの無い電気浸透流ポンプを用いる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数の種類の細胞を分離する装置であって、細胞の導入口、細胞を移動するための流路、分離した細胞を導く複数の分岐流路と細胞を輸送するための複数のポンプ手段が一枚の板や棒状のものに一体で形成されており、当該ポンプ手段を作動させたときに細胞に直接電界が印加されることが無いことを特徴とし、また細胞を識別する検出手段からの信号に基づき、それぞれのポンプ手段を作動あるいは不動作として所望の分岐流路に所望の種類の細胞を導き細胞分離を行うことを特徴とした細胞分離装置。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のポンプ手段が特に電気浸透流ポンプであることを特徴とする細胞分離装置。

【請求項 3】 請求項 1 に記載のポンプ手段が特に電気浸透流ポンプであることを特徴とする細胞分離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、健康状態の判断や、免疫診断、免疫治療を行うために、血液に含まれるリンパ球等の細胞を、電気泳動速度や比重の違いを利用して T 細胞、B 細胞等の亜集団に区別し、その数を計測し、または其々の亜集団に分離するための分離手段ならびにその装置に関する。特に必要な機能、構造の一部が一つの板状のチップに集積されており、必要な検体が微量で済み、携帯性、即時性、使い捨て、安価などを特徴とする微小流体力学や *micro-TAS*、*Lab-on-a-Chip* といわれる分野に関する。

【0002】

【従来の技術】リンパ球は体内の免疫機能を担う中心であり、機能的系統的にいくつかの異なる細胞集団である。B 細胞、キラー T 細胞、ヘルパー T 細胞、サブレッサー T 細胞などのリンパ球亜群から構成されている。リンパ球は言うまでもなく個体の免疫応答に関する様々な情報をもっており、ある亜群を分取し詳細に調べること、または抹消血中のリンパ球亜群の比率を測定するだけでも、免疫診断を行うための有益な情報を得ることができる。あるいはある種のリンパ球を体外で培養し、体内に戻すような免疫治療を行う上でも、リンパ球亜群の区別・分離は重要かつ一般的基本的なものとなってきた。

【0003】通常、このようなリンパ球亜群比率の測定や、特定の亜群の分取には、特定の亜群と結びつく蛍光抗体を作用させたリンパ球を、ノズルから細かい水滴に含まれる形で空中に押し出し、その一つ一つの蛍光や散乱から亜群を区別・計数し、さらに静電力によって特定の亜群を含む水滴だけの軌道を曲げ分取する、フローサイトメトリー法が使用されるが、これは装置も大掛かりで高価なものであり、メンテナンスも大変で、必要な時に手軽に使えるものではなかった。簡易的な方法としては、特定の亜群だけを吸着するように、表面に抗体を固

定化するなどした特殊な繊維状やビーズ状の樹脂が詰められたカラムを通すことにより、分離する方法があるが、これはリンパ球を損傷したり、カラムのコンディショニングに手間が掛かったり、また滴下速度などの条件により吸着率が異なり、定量性に問題がある。また細胞電気泳動装置やフリーフロー電気泳動装置を用い、表面電荷濃度の違いにより、T 細胞と B 細胞を分離する方法は、以前はよく使用されたが、やはり装置が大型で、近年はフローサイトメトリー法に取って代わられつつあるが、この手法の利点は、抗体を用いないため細胞の損傷が少ないことにあり、免疫治療を目的とした用途等に現在も使われている。

【0004】近年、*micro-TAS*、*Lab-on-a-Chip* という技術分野が立ち上がりつつあり、従来の分析技術や化学合成法を、一つのチップの上に集積化することで、システムの小型化、必要な試薬や検体量の縮小化、低コスト化、高速化、高機能化を実現している。このようなチップ上でリンパ球の T、B 細胞分離を行った例はすでに公知となっている。（特願 2001-304178）本方法によれば緩衝液の pH 変化を抑制しながら、一箇所にバンド状に並べたリンパ球を電気泳動させることによって T と B 細胞に分離できる。また、遠心分離と電気泳動を同時に行うことによって同様にこれらの細胞を分離できることが示されている。

【0005】また、家庭や緊急医療現場で、一滴の血液から、人間の健康管理に必要な血液分析を 1 チップで行うことを目的とした、ヘルスケアデバイスのような、血液分析チップが最近開発されている。（特開 2001-258868）もし 1 チップ上で細胞分離が可能であれば、免疫診断から健康管理に有益な情報が得られる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】このように、現在細胞分離に用いられているフローサイトメトリ装置は大がかりで高価なものであることから、これが免疫診断、免疫治療の恩恵を万人が浴するための一つの大きな障壁となっている。もしこのような細胞分離がチップ上で実現できれば、小型、安価、簡便、即時などのチップ化のメリットにより、日常的免疫診断、健康管理といったことに適用することができ、人々の安寧に寄与するところ大である。さらに当該フローサイトメトリ法の場合、細胞分離の際に電界を細胞に印加しているため、細胞に少なからず損傷を与えてしまうという問題があった。

【0007】またチップ上で電気泳動を用い細胞分離を行う場合においても細胞に電界を印加しているために細胞に損傷を及ぼしていると考えられ、これは細胞分離の応用を著しく狭める大きな問題である。

【0008】

【課題を解決するための手段】細胞に悪影響を及ぼす電界などを印加すること無く、細胞分離を行うためにダウンフロー型の電気浸透流ポンプを用いる。当該ポンプに

つについては公知例（特願 2001-116091）に詳しいが、図 1 を用いて簡単に説明する。流路手段 101、上流流路 102、小断面積流路 103、下流流路 104 および液溜め 110 には予め電解液が満たされており、これら流路の途中には 2 箇所のゲル電極 105 および 107 を介して白金電極 106 および 108 が接続されている。また 109 も流路手段であり、上流の様々な以降と接続されている。今、図中の矢印方向に電解液の輸送を行いたいとすると、上流側の白金電極 106 に正の電圧を印加し、下流側の白金電極 108 は接地する。これにより当該電極 106、108 間に印加された電圧により生じる電気浸透流のために、流路内の電解質液体は図中の矢印の向きに移動する。この結果、上流側の流路手段 109 には陰圧（吸引力）が生じるため、図 1 に示した機構がポンプとしての作用を有することを示している。ここで電圧をゲル電極を介して印加しているのは、電極反応に伴う水素や酸素の発生や電解質溶液の pH 変動を抑制するためであり、また小断面積流路 103 を有するのはより高いポンプ力を得るためである。ここで強調しておくべきことは図 1 に示した電気浸透流ポンプの上流側においては、電解液に電界が全く印加されていないことである。すなわち当該ポンプをチップ上に形成して細胞分離に用いた場合、細胞に直接電界を印加すること無く任意の細胞を任意の方向に輸送することができるので、これを細胞の検出手段と組み合わせることにより複数の種類の細胞をそれぞれ任意の細胞貯めに分別することができる。

【0009】

【発明の実施の形態】図 2 に本発明に基づき、作製した細胞分離チップとその周辺構成図を示す。201 はチップを構成する基板であり、この上には検体である細胞の液溜め 202、流路 203 があり、その下流において流路は Y 字に分岐し、それぞれ分岐流路 A 204 および分岐流路 B 205 がある。それぞれの分岐流路の下流にはそれぞれ電気浸透流ポンプ A 206 と電気浸透流ポンプ B 207 が配置されている。今、液溜め 202 に 2 種類の細胞を複数個入れて液溜め及び流路を緩衝液などの液体で満たす。このとき 1 種類の細胞には予め蛍光抗体を付着させてある。（この場合蛍光抗体を付着させた細胞を細胞 A、付着させていない細胞を細胞 B とする）その後、圧力流あるいはチップ上の電気浸透流ポンプにより細胞を下流へと導く。このとき流路 203 の途中において、光源 210 から光を照射し、この光により細胞表面に蛍光抗体がある場合には蛍光を発し、この蛍光は検出器 211 により検出される。同時にこの地点を通過する細胞は CCD カメラ 212 によっても観察している。これらのデータは制御コンピュータ 213 に送られ、細胞の流速と観察地点から Y 字分岐地点までの距離から、電気浸透流ポンプ A と B のオンあるいはオフのタイミングを算出する。すなわち、いま蛍光を発する細胞（すなわ

ち細胞 A）を検出したとすると、その細胞が Y 字分岐路に達する直前に電気浸透流ポンプ A をオン、電気浸透流ポンプ B をオフにし、細胞 A を分岐流路 A へと引き込む。蛍光を発しない細胞 B の場合にはその逆に電気浸透流ポンプ A をオフ、電気浸透流ポンプ B をオンとし、これを分岐流路 B へと引き込む。このようなことを繰り返すことで 2 種類の細胞を電界などを印加することなく電気浸透流ポンプによる液体の流れのみで分離することができる。なお蛍光を発しない細胞 B の場合は CCD カメラ 212 によって当該細胞を確認している。

【0010】上の場合、2 種類の細胞を蛍光の有無により見分けていたが、その他の細胞の形状の違いから見分けるなどの方法でも同様に細胞を分別することができる。

【0011】

【実施例】〔第一の実施例〕図 2 に示した細胞分離チップを用い、リンパ球の T 細胞の内の CD4 と CD8 の分離を試みた。チップ基板としては安価なポリエチレンテレフタレート（PET）を用い、これを流路や液溜めパターンを光露光法や乾式エッチング法を用いて形成した石英製の型に押し当て、チップ基板にパターンを転写、形成した。この CD4 と CD8 の個数比を調べることによって後天性免疫不全症候群（AIDS）や B 型肝炎の診断が可能である。あらかじめ CD4 にのみ付着する蛍光抗体処理をこれらの細胞に施し、液溜め 102 に導入する。このとき流路と液溜め全体を HBSS 溶液（HEPES buffered Hanks' balanced salt solution）で満たす。その後細胞を下流へと流し、その途中で蛍光の有無を検出してそのデータより電気浸透流ポンプのオン、オフにより細胞を分離していく。その結果分岐流路 A に蛍光を発する CD4 のみが、分岐流路 B に蛍光を発しない CD8 のみが分離できていることが確認された。

【0012】〔第二の実施例〕図 3 には図 2 に示した細胞分離チップを改造したものを示している。同図において図 2 と同じ名称のものは、図 2 の符号をそのまま用いた。この場合、2 つの分岐流路の途中に電気浸透流ポンプを設置し、またその下流にそれぞれ分別した細胞を溜めておく細胞溜め A 301 と細胞溜め B 302 を設置しているところが図 2 と異なる。こうすることによって図 1 の場合に多数の細胞を分別する際にそれぞれの分岐流路のポンプ上に細胞が集まり、それが抵抗となってポンプ能力が低下してきてしまっていたが、図 2 のように途中に電気浸透流ポンプを設置して、さらにその下流に液溜めを設けることで分別した細胞を液溜めに格納しながら細胞を分別していくことができる。実際に第一の実施例と同様に CD4 と CD8 の分離を試みたところ電気浸透流ポンプの能力の低下を伴うことなくこれらを分別することができた。

【0013】

【発明の効果】以上に述べたとおり、本発明による細胞分離装置では、複数の細胞の種類を蛍光や細胞形状から判断し、その結果から電気浸透流ポンプを制御して細胞を分離していく。電気浸透流ポンプは細胞に直接電界を印加することはないので、非損傷の細胞分離が実現することができる。本発明においては2種類の細胞の分離を行ったが、分岐流路を多くするかそれらを多段は位置することにより、より多くの種類の細胞を同時に分離することが可能であることは容易に推測することができる。さらに本発明の細胞分離装置は従来装置と比較して小型かつ安価に構成できるので、これにより多くの人々に免疫診断、免疫治療を提供することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 電気浸透流ポンプを説明する図である。

【図2】 本発明の細胞分離装置の構成を説明する図である。

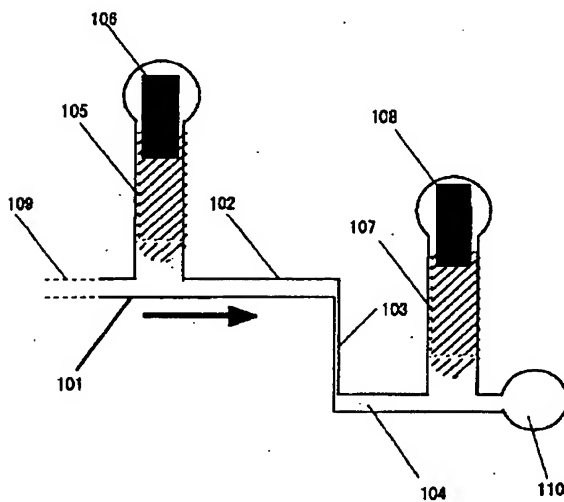
【図3】 本発明の細胞分離装置の構成を説明する図である。

【符号の説明】

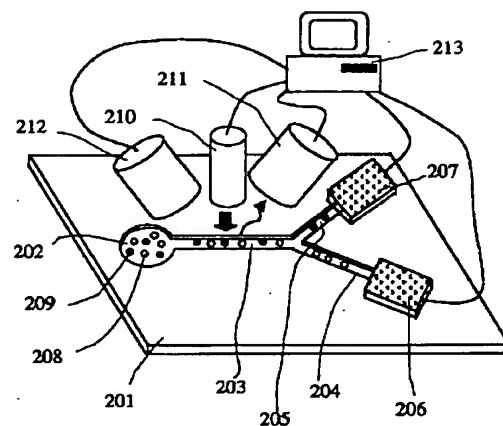
101 流路手段
102 上流流路
103 小断面積流路
104 下流流路

105 ゲル電極
106 白金電極
107 ゲル電極
108 白金電極
109 流路手段
110 液溜め
201 基板
202 検体入口液溜め
203 流路
204 分岐流路A
205 分岐流路B
206 電気浸透流ポンプA
207 電気浸透流ポンプB
208 細胞A
209 細胞B
210 光源
211 検出器
212 CCDカメラ
213 制御コンピュータ
301 細胞溜めA
302 細胞溜めB

【図1】



【図2】



(72)発明者 斧田 博之
兵庫県神戸市北区星和台1丁目18番20号

(72) 発明者 堀池 靖浩
東京都西東京市東伏見3丁目2番地12号
Fターム(参考) 4B029 AA23 AA27 BB11 CC01
4B065 AA90X BA30 CA44 CA46